



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0107536
(43) 공개일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/075 (2010.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/89 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0609 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0030401
(22) 출원일자 2015년03월04일
심사청구일자 2015년03월04일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
공일근
경상남도 진주시 남강로477번길 7, 가동 602호(신안동, 한주빌라)
김유곤
부산광역시 사하구 다대로 473, 110동 1601호(다대동, 현대아파트)
(74) 대리인
위병갑

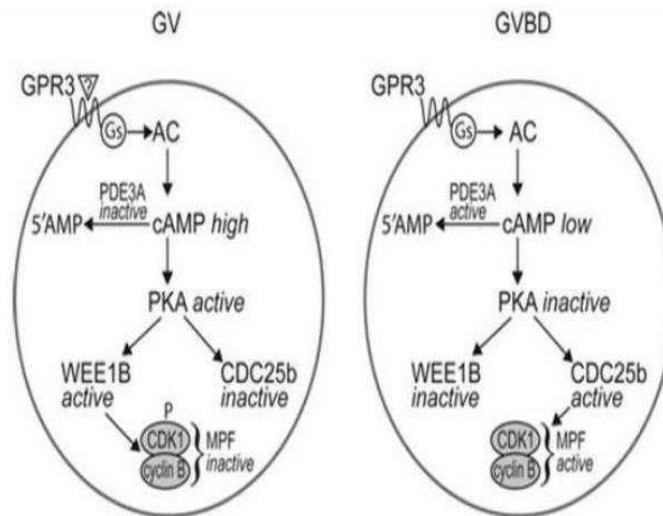
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 개 난자 핵성숙 촉진방법

(57) 요약

본 발명은 개의 난자를 체외 성숙(in vitro maturation) 시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, Wee1B 유전자의 비활성화를 통해 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 높여 GV(germinal vesicle) 단계에서 MI(metaphase I) 단계로의 개 난자의 핵성숙을 촉진시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/89 (2013.01)

C12N 2500/00 (2013.01)

C12N 2500/05 (2013.01)

C12N 2500/24 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2501/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00897504

부처명 농림부

연구관리전문기관 국립축산과학원

연구사업명 국책기술개발사업

연구과제명 개 미성숙 난자의 활용기술 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 난자에 도입하는 것을 특징으로 하는, 난자 핵 성숙을 촉진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 난자는 개과 동물 유래 난자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Wee1B의 발현 억제제는 Wee1B 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 RNAi로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이고,

상기 Wee1B의 활성 억제제는 Wee1B 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 도입은 미세주입법(microinjection)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 방법은 Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 난자에 도입한 후 48 시간 내지 72시간 동안 체외 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 체외배양은 글루코오스, 푸트레신(putrescine), 프로게스테론, 소듐 세레나이트, 인슐린, apo-트랜스페린, EGF 및 페니실린을 포함하는 TCM-199 배지에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 방법은 Wee1B 유전자의 비활성화를 통해 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 높임으로써 GV(germinal vesicle) 단계에서 MI(metaphase I) 단계로의 난자 핵 성숙을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 개과 동물 난자 핵 성숙 촉진용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 Wee1B의 발현 억제제는 Wee1B 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 작은

간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 RNAi로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이고,

상기 Wee1B의 활성 억제제는 Wee1B 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 개과 동물 난자 핵 성숙 촉진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개의 난자를 체외 성숙(in vitro maturation) 시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, Wee1B 유전자의 비활성화를 통해 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 높여 GV(germinal vesicle) 단계에서 MI(metaphase I) 단계로의 개 난자의 핵성숙을 촉진시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명공학 또는 유전자 조작기술의 발달에 따라 원하는 형질들로 조합한 다양한 재조합 생명체들의 여러가지 생산 성공사례가 발표되어 왔고, 최근에는 예컨대 양 등과 같은 복제 동물들의 생산에 성공한 사례들이 속속 보고되었다.

[0003] 복제 동물을 생산하는 기술은 상업적 유용성뿐 아니라, 생체의학과 생물학 연구에 있어서도 그 중요성은 압도적이다. 복제 동물 생산기술의 산업적 적용분야는 고품질의 축산식품 생산, 고부가가치의 약리활성물질 생산, 각종 병원균에 대한 생체저항력 향상동물 생산, 질환 모델 동물의 생산 및 유전자치료 분야에 이르기까지 매우 광범위하다.

[0004] 복제 동물의 다양한 용도 중에서도, 소, 돼지와 같은 산업동물의 복제와 더불어, 요즘 같은 산업화 및 정보화 시대를 거처오면서 개, 고양이 등의 애완동물 및 반려 동물의 복제는 많은 사람들의 관심의 대상이 되고 있다.

[0005] 이 중 특히 반려견에 대한 심리적 의존도가 급격히 증가하고 있고, 개과 동물의 우수한 능력을 이용하는 검역견이나 마약탐지견과 같은 특수목적견의 필요성도 증가하고 있다. 또한, 인간의 난치질환 연구모델분야에서는 여러 한계가 있는 설치류를 대신하여 개과 동물이 선호되고 있는 추세이다. 개는 인간과 생리학적 특성이 비슷하고 사람과 동물의 유사한 질병 발생 패턴을 을 가지고 있어 병리학적, 생리학적으로도 유사하며, 실제로 인간 질병연구에 응용할 수 있는 유전 질병의 수가 65개의 돼지나 136개의 고양이와 비교해 개는 224개로 월등히 많아 (<http://omia.angis.org.au/>) 이러한 유전 형질을 이용하여 인간의 질병모델 복제개를 만들면 인간 질병연구에 큰 도움이 되는 중요한 의미가 있다.

[0006] 그렇기 때문에 오랜 기간 개복제에 대한 시도가 이루어져왔으나, 현재까지 개 복제는 여전히 성공률이 극히 낮고, 성공하기 어려운 복제로 여겨지고 있으므로, 개과 동물의 복제 효율을 향상시키기 위한 다양한 방법이 필요한 실정이다.

[0007] 특히, 포유동물의 미성숙 생식 세포를 체외 성숙(in vitro maturation)시키기 위한 최초의 시도와 성공 이래로 (Pincus and Enzmann, 1935; Edwards, 1965a; Edwards, 1965b), 많은 포유동물에서의 연구가 진행되어 왔다.

[0008] 체외에서 발달한 수정란이나 이를 이용한 배아는 체내에서 만들어진 배아에 비하여 발달률이 낮은데, 그 이유에 대한 연구가 오랫동안 많은 연구자의 관심이 되어오고 있다. 불임환자의 치료를 위한 체외수정이나 복제동물의 생산과 같이 인류복지를 위한 연구의 발전에 가장 큰 장애물로 남아 있는 것이 바로 이 체외에서 발달한 난자 및 배아의 상태가 정상적인 발달에 비하여 부족하다는 것인데, 아직 그것을 해결하지 못한 상황이다.

[0009] 이에 본 발명자들은 복제 동물의 향상된 생산방법을 연구하던 중, Wee1B-siRNA를 이용하여 Wee1B를 비활성화 시킴으로써 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 높여 개 난자의 핵성숙을 촉진할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 1. Suzukamo C, Hoshina M, Moriya H, Hishiyama N, Nakamura S, Kawai F, et al. Kinetics of nuclear status and kinase activities during in vitro maturation of canine oocytes. J

Reprod Dev 2009;55(2):116-20.

(비특허문헌 0002) 2. Evecen M, Cirit U, Demir K, Hamzaoglu AI, Bakirer G, Pabuccuoglu S, et al. Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dog oocytes. Theriogenology 2011;75(9):1647-51.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 Wee1B의 불활성화를 이용하여 난자 핵 성숙을 촉진시키는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 개과 동물 난자 핵 성숙 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 일 구체예로서,
- [0014] Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 난자에 도입하는 것을 특징으로 하는, 난자 핵 성숙을 촉진시키는 방법 및 이의 이용을 제공한다.
- [0015] 이 때, 상기 난자는 개과 동물 유래 난자인 것이 바람직하다.
- [0016] 상기 Wee1B의 발현 억제제는 Wee1B 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 RNAi 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 Wee1B의 활성 억제제는 Wee1B 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드 및 항체 등으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 Wee1B의 작은 간섭 RNA(siRNA)를 사용하였다.
- [0017] 이 때, Wee1B의 발현 또는 활성 억제제의 난자로의 도입은 임의의 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있는데, 바람직하게는 미세주입법(microinjection)을 이용할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 난자에 도입한 후에는, 48 시간 내지 72시간, 바람직하게는 70~72 시간 동안 체외배양한다.
- [0019] 일 예로, 상기 체외배양은 글루코오스, 푸트레신(putrescine), 프로게스테론, 소듐 세레나이트, 인슐린, apo-트랜스페린, EGF 및 페니실린을 포함하는 TCM-199 배지에서 이루어질 수 있다.
- [0020] 본 발명의 방법은 Wee1B 유전자의 비활성화를 통해 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 높임으로써 GV(germinal vesicle) 단계에서 MI(metaphase I) 단계로의 난자 핵 성숙을 촉진시키는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 한편, 본 발명은 다른 구체예로서, Wee1B의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 개과 동물 난자 핵 성숙 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0022] 이 때, 구성요소에 대한 설명은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0023] 이처럼, 본 발명은 Wee1B 유전자를 비활성화시켜 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 증진시킴으로써 궁극적으로 개 난자의 핵성숙을 촉진시킬 수 있는 사실에 기반한 것으로, 이와 관련된 모든 이용 태양을 포함한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 간단한 방법에 의해 개 난자의 핵성숙을 촉진시킬 수 있으므로, 경제적이고 효율적으로 특수 목적견 등의 복제 생산에 유용하게 적용할 수 있을 것이다. 또한, 자연발정기 개체의 난자를 직접 채취하여 활용함으로써 관련비용을 절감하고 수술과정의 어려움을 줄여줌으로써 생산효율을 높일 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 Hoechst 33342 염색을 통한 개 난모세포의 핵 성숙 단계를 나타낸 것이다[A: GV(germinal vesicle); B:

GVBD(germinal vesicle break-down); C: MI(metaphase I); D: MII(metaphase II)].

도 2는 난모세포에서 Wee1B 메커니즘과 관련된 중요항 유전자의 발현을 관찰한 결과이다.

도 3은 Wee1B 메커니즘과 관련된, GV단계에서 GVBD단계로 핵의 발달 진행에 대한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명에서 사용되는 대표적인 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0027] "배양"은 생물체나 생물체의 일부(기관 조직 세포 등)를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일로써, 이 경우 외적 조건으로 온도 습도 빛 기체상의 조성(이산화탄소나 산소의 분압) 등이 중요하며, 그 밖에 배양되는 생물체에 가장 중요한 직접적인 영향을 주는 것은 배지(배양기)로, 그 생물체의 직접적인 환경인 동시에 생존이나 증식에 필요한 각종 영양소의 공급장이다.
- [0028] "체외배양"이란 세포 등이 체내에서 자라는 상태와 구분되는 방법으로 실험실의 인큐베이터(incubator)에서 체내의 환경과 유사한 조건으로 배양하는 일련의 실험실 과정을 의미하는 것이다.
- [0029] '배지' 또는 '배지 조성물'은 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외에서 세포 등의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 말한다.
- [0030] '복제'는 한 개체와 동일한 유전자 세트를 가진 새로운 개체를 만드는 유전자 조작기술로서 특히 본 발명에서는 개과 동물의 체세포, 배아 세포, 태아 유래 세포 및/또는 성체 유래 세포가 다른 세포의 핵 DNA 서열과 실질적으로 동일한 핵 DNA 서열을 갖는 것을 말한다. 본 발명은 핵 이식 기술을 이용하여 개과 동물을 복제하는 기술에 관한 것이다.
- [0031] '핵 공여 세포'는 핵 수용체인 수핵 난자로 핵을 전달하는 세포 또는 세포의 핵을 말한다.
- [0032] '난자'는 바람직하게는 제2차 감수분열 중기까지 도달한 성숙난자를 말한다.
- [0033] '수핵 난자'는 탈핵 과정을 통해 본래의 핵이 제거되고 공여핵원세포로부터 핵을 전달 받는 난자를 말한다.
- [0034] '융합'은 핵 공여 세포와 수핵 난자의 지질막 부분의 결합을 의미한다. 예를 들어, 지질막은 세포의 플라스마막 또는 핵막이 될 수 있다. 융합은 핵 공여 세포와 수핵 난자가 서로 인접하게 위치해 있는 경우 또는 핵 공여 세포가 수핵 난자의 주란강(perivitelline space) 내에 위치해 있는 경우에 전기적 자극을 가함으로써 일어날 수 있다.
- [0035] "벡터(vector)"는 외래 유전자를 숙주세포 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체로서의 DNA 분자를 말한다. 유용한 벡터가 되기 위해서는 복제될 수 있어야 하며, 숙주세포 내로 유입될 수 있어야 하고, 자신의 존재를 검출할 수 있는 수단을 구비하여야 한다. 상기 벡터에 의하여 특정 유전자에 외래 유전자를 삽입시키거나 특정 유전자 형질발현을 봉쇄(knock-out)시킬 수 있다. 본 발명의 일례에서는 형질전환 핵 이식 배아에 대한 마커인 RFP(red fluorescent protein) 유전자를 삽입시켰다.
- [0036] '형질전환(transgenesis)'은 어떤 생물이 원래는 지니고 있지 않은 외부 유전자를 염색체상에 인위적으로 삽입하거나, 원래 지니고 있는 유전자를 제거하여 그 생물의 유전적 형질 일부를 변화시키는 것이다. 형질전환의 방법은 여러 가지가 있으나 가장 많이 사용되는 방법으로는 지질 매개 유전자 도입(lipid mediated gene transfer), 정자 매개 유전자 도입(sperm mediated gene transfer), 전기천공법(electroporation), 상동성 재조합(homologous recombination), 미세주입법 등이 대표적이다. 본 발명에서는 미세주입법을 이용하였다.
- [0037] 'siRNA' 용어는 표적 mRNA의 번역을 막는 이중 가닥 RNA 분자를 의미한다. RNA가 전사되는 주형으로 DNA를 포함하는, siRNA를 세포에 도입하는 표준기술이 사용된다. 상기 siRNA는 dsRNA 또는 shRNA 모두 가능하다. 'dsRNA'는 한 개 가닥과 이에 상보적인 서열을 가지는 다른 가닥으로 구성된 두 개의 RNA 분자 컨스트럭트를 지칭하며, 두 분자는 상보적 서열을 가지므로 서로 결합하여 이중-가닥의 RNA 분자를 형성한다. 두 가닥의 핵산 서열은 표적 유전자 서열의 단백질 암호화 서열에서 선택된 RNA의 "센스" 또는 안티센스서열 뿐만 아니라 표적 유전자의 비암호화 영역(non-coding region)에서 선택된 RNA 분자도 포함될 수 있다. 'shRNA' 용어는 서로 상보적인 첫 번째 및 두 번째 영역, 즉 센스 및 안티센스 가닥을포함하는 줄기-루프 구조(stem-loop structure)를 가지는 siRNA를 지칭한다. 상보성의 정도와 상보성 부위의 방위가 충분하면 상기 영역간의 충분한 염기쌍의 결합이 일어나고, 첫 번째 부위와 두 번째 부위는 루프 부위에 의해 연결되고, 루프 부위는 루프 부위의 핵산(또는 핵산

유사체)간의 염기쌍의 부재에 의해 이루어진다. 상기 shRNA의 루프 부위는 센스 및 안티센스 가닥의 사이의 단일 가닥 부위이며, 또한, 개입한 단일 가닥으로 지칭될 수 있다.

- [0038] '핵 재프로그래밍(nuclear reprogramming)'는 핵 이식 과정 중 수핵 난자와 공여 세포를 융합한 후 공여 세포주의 핵이 재구성 되어 핵 이식란(복제 수정란)의 정상적인 발생을 유도하는 과정을 말하는 것으로, 일정 시간을 향한 배양하는 것으로 달성할 수 있다.
- [0039] '활성화'는 핵 전이 단계 전, 핵 전이 단계 동안 및 핵 전이 단계 후에 세포가 분열하도록 자극을 주는 것을 말한다.
- [0040] '개과 동물(canidae)'은 크게 개족(Tribe Canini)과 여우족(Tribe Vulpini)으로 나눌 수 있고, 개, 늑대, 재칼, 여우, 송냥이, 너구리, 코요테 등이 포함될 수 있다. 바람직하게는 개 또는 늑대가 포함된다. 상기 개는 야생의 늑대가 가축화된 것으로 알려져 있으며 이에 따라 늑대와 개는 염색체 수가 동일하고 임신기간, 성 호르몬의 변화가 유사한 양상을 나타낸다(Seal US et al., Biology Reproduction 1979, 21:1057-1066). 본 발명에 있어서 상기 '개과 동물'이라는 용어에 대하여, '개'로 단순히 줄여서 혼용하여 쓰기도 한다.
- [0041] '약'이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0042] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "함유하다" 및 "포함하다"란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0043] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0044] 본 발명은 난자의 성숙에 관한 것이다.
- [0045] 난자는 포유동물 세포 중 가장 오래 사는 세포로 오랜 기간 동안 1차 감수분열의 중복염색체기(diploten stage)에서 휴지상태로 유지되고 있다가 월경주기 중 배란기 LH surge 후 감수분열이 재개된다. 1차 감수분열 휴지기의 난자를 배소낭 (GV;germinal vesicle) 상태의 난자라고 한다.
- [0046] 감수분열이 재개되면 배소낭 파괴 (GVBD; germinal vesicle breakdown)가 일어나고 염색질이 응축 (chromatin condensation)되고 미세소관이 재구성 (microtubule reorganization)되어 중기 방추 (metaphase spindle)를 형성하고 1차 감수분열을 마친 후 2차 감수분열의 중기 난자 (MII stage oocyte; metaphase II stage oocyte)로 성숙되어 정자와 수정될 수 있는 능력을 가진다.
- [0047] 이 과정을 난자의 성숙 (oocyte maturation)이라 한다.
- [0048] 동물실험에서 미성숙난자를 성숙시키는 배양법은 크게 3가지로 나눌 수 있다. 난포로부터 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자를 획득한 후 난구세포를 제거한 미성숙난자 (DO; denuded oocyte)를 배양하는 방법과 난구세포로 둘러싸인 미성숙난자 (CEO;cumulus cell enclosed oocyte)를 배양하는 방법, 난포전체를 분리하여 배양하는 방법으로 나누어진다.
- [0049] 난자의 성숙은 protein kinase와 protein phosphatase 에 의한 단백질의 인산화 (phosphorylation), 탈인산화 (dephosphorylation)에 의해 조절되고, 성숙촉진 인자 (MPF; maturation promoting factor)가 조절의 중추 역할을 맡고 있다. 또 성숙촉진인자와 함께 최근 MAPK 경로 (mitogen-activated protein kinase cascade)가 난자 성숙에 중요한 역할을 함이 알려져 있다
- [0050] 난자성숙억제는 난자성숙억제물질 cAMP에 의해 유지되는데 난자내 cAMP양은 난소자극호르몬에 의해 과립막세포에서 만들어져 난자와 난구세포 사이의 Gap junction을 통해 난자로 이동된 cAMP와 난자의 Gs G-Protein과 Gs-coupled G-protein receptor, GPR3에 의해 생긴 cAMP 등으로 이루어진다. 이 cAMP는 PKA를 활성화하고 활성화된 PKA는 MPF를 인산화 (불활성 MPF)하여 난자성숙을 억제한다.
- [0051] **Wee1B**
- [0052] 본 발명자들은 Wee1B 유전자를 비활성화시킴으로써 이러한 MPF(Maturation Promoting Factor)의 활성을 높여

개 난자의 핵성숙을 촉진시키는 사실을 발견하였다.

- [0053] MPF(Maturation Promoting Factor)는 p34^{cdc2}와 Cyclin B로 구성된 복합체로서 세포분열 및 세포주기를 조절하는 중요한 인자이다. 제 1 극체가 방출된 성숙난자의 세포질에는 고농도의 MPF가 존재하며, 공여핵세포와의 융합이 일어난 후 핵막붕괴(nuclear envelope breakdown)와 염색체응축(premature chromatin condensation)을 유도하여 첫DNA 복제를 준비하게 된다. 따라서 MPF 및 이와 관련된 다양한 세포신호전달물질은 융합, 활성화 후 배아 발달에 큰 영향을 미친다.
- [0054] 본 발명은 Wee1B를 비활성화시키면, MPF 활성화에 의해 개 난자의 핵이 MI단계에 많이 머물러 있게 함으로써 GV 단계에서 MI 단계로의 핵성숙을 촉진시키는 메커니즘에 기반한다.
- [0055] "Wee1B"는 유사분열 과정 중에 mitosis promoting factor (MPF)를 이루는 cdc2의 15번 아미노산의 인산화를 관장함으로써 유사분열이 진행되지 않도록 억제하는 역할을 하는 중요한 유전자인데 Wee1B 유전자는 GV단계에서 MPF inactive에 관여한다.
- [0056] 본 발명에 따른 상기 Wee1B는 바람직하게 서열번호 1로 이루어진 펩타이드로 구성된 것일 수 있으며, Wee1B의 유전자는 서열번호 2로 이루어진 폴리뉴클레오티드로 구성된 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명은 일 관점에서, 이러한 메커니즘에 기초하여 Wee1B의 발현 또는 활성 억제를 통하여 난자의 핵 성숙을 촉진시키는 방법에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명의 방법은 난자의 유래에 제한 없이, 그러나 바람직하게는 포유류 유래 난자, 더욱 바람직하게는 개과 동물의 난자의 성숙에 사용될 수 있다.
- [0059] 개과 동물은 다른 포유동물의 경우와는 달리 배란 후 수 시간 동안 난관에 머물면서 미성숙 난자가 성숙 난자가 된다. 포유동물의 경우 난자는 성숙 난자, 즉 제2차 감수분열 중기(metaphase II)에 배란이 되는데 반해, 개과 동물의 난자는 제1차 감수분열 전기에 배란되어 난관 내에서 48-120시간 동안 머물면서 성숙과정을 거치는 것이 특징이다.
- [0060] 생체 내 난자를 회수하는 방법으로는 대상 동물을 마취한 후 개복시키는 것을 포함하는 외과적 방법을 사용할 수 있다.
- [0061] 보다 구체적으로, 생체 내 난자의 회수는 당업계에 공지된 방법인 난관 절제법을 사용할 수 있다. 상기 난관 절제법은 난관을 수술적으로 잘라낸 후 배아 수집 배지를 난관 내부에 관류시켜 관류액을 수득하고 상기 관류액으로부터 난자를 회수하는 방법이다.
- [0062] 또한, 생체 내 난자는 카테터를 난관체에 장착한 후 난관-자궁 접합부위에 주사침을 이용하여 관류액을 주입함으로써 회수할 수 있다. 이 방법은 난관을 손상시키지 않기 때문에 난자를 공여하는 동물을 다음 발정에도 이용할 수 있다는 장점이 있다.
- [0063] 본 발명은 난자의 핵 성숙을 촉진시키기 위해, Wee1B 유전자를 비활성화시키는 것을 중요한 특징으로 한다.
- [0064] 즉, Wee1B의 발현 또는 활성 억제를 통하여 MPF (Maturation Promoting Factor)의 활성을 증가시킨다.
- [0065] 본 발명에 있어서, Wee1B의 발현 또는 활성 억제하기 위하여 Wee1B 유전자의 전사를 억제하는 물질, 전사된 Wee1B의 번역을 억제하는 물질, 또는 Wee1B 단백질의 기능을 억제하는 물질로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 상기 전사를 억제하는 물질로는 Wee1B 유전자의 전사를 조절한다고 알려져 있는 인핸서(enhancer)/프로모터에 결합되는 전사조절인자에 결합하는 단백질 또는 화합물을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 상기 mRNA의 번역을 억제하는 물질로는 저분자 화합물, 안티센스 핵산 서열의 제조나 RNAi 테크닉을 이용한 RNA, siRNA 또는 shRNA 등을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 보다 바람직하게 상기 Wee1B의 발현 또는 활성 억제로는 서열번호 3으로 이루어진 Wee1B의 siRNA를 사용할 수 있다.
- [0068] 이를 구체적으로 살펴보면 하기와 같다:
- [0069] RNAi

- [0070] RNAi는 특이적 유전자억제 현상을 의미하나, 본 발명에서는 이러한 현상을 나타내는 "RNAi 시약"을 의미하는 용어로 혼용되어 사용되고 있으며, 그 구성은 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 그의 유사체로서, 변형된 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함할 수도 있다. 적합한 변형은 본 기술분야에서 공지되어 있다 [참조예: Uhlmann, Current Opin. Drug Discovery Dev., Vol. 3, No. 2, pp. 203-213 (2000); 및 Uhlmann and Peyman, Chem. Rev., Washington, DC, Vol. 90, No. 4, pp. 543-584 (1990)].
- [0071] RNAi는 단일-스트랜드 및 이중-스트랜드 핵산 분자 둘 다를 포함 한다. 이중-스트랜드 핵산 분자는 두개의 별도의 스트랜드로, 또는 이중-스트랜드 구조를 형성할 수 있는 두개의 영역을 포함하는 하나의 스트랜드와 헤어핀 루프 (hairpin loop)를 형성하는 두개의 영역 사이의 스페이서 (spacer) 영역으로 구성될 수 있다.
- [0072] 이러한 RNAi는 표적 유전자에 대해 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명과 관련하여 표적 유전자에 대해 상보적이라는 것은 그 서열이 프리-mRNA, mRNA, cDNA를 포함한, 표적 유전자의 DNA 서열로부터 전사된 RNA에 대해 상보적인 것을 의미한다. "표적 유전자"는 세포, 조직 또는 유기체 내에서 발현되는, 즉 RNA로 전사되는 어떤 DNA 서열이라도 포함하는 것을 의미한다. 발현된 서열은 단백질로 반드시 번역될 필요는 없으며, 예를 들어, 프리-mRNA, 조절성 RNA, rRNA 등을 포함한다. 표적 유전자에 대해 상보적인 서열은 일반적으로 길이가 약 19-23 뉴클레오타이드이지만, 더 길 수도 있다.
- [0073] Wee1B RNA 간섭(RNAi)은 Wee1B 유전자에 대응하는 두 가닥 사슬 RNA(dsRNA)를 세포 또는 유기체에 도입함으로써 대응하는 Wee1B mRNA의 분해가 일어나는 전사 후 유전자 사일런싱 메카니즘(post-transcriptional gene silencing mechanism)이다. 상기 RNAi 효과에 의해 Wee1B 유전자 발현이 복귀되기 전에 다중 세포 분열이 지속되므로 RNAi는 RNA 레벨에서 목표로 하는 녹아웃(knockout) 또는 '녹다운(knockdown)'을 만드는 매우 강력한 방법이다. RNAi 타입에 대한 예로는 예를 들어, siRNA 또는 miRNA (마이크로RNA) 또는 소형 헤어핀 RNA (shRNA)가 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 Wee1B 녹다운 방법으로 Wee1B siRNA를 사용하였다.
- [0074] 유전자 사일런싱에서의 RNAi 기술은 표준 분자 생물학 방법을 이용한다. 불활성화시킬 표적 유전자의 서열에 대응하는 dsRNA는 표준 방법, 예를 들면 T7 RNA 중합효소를 이용한 주형 DNA의 양 가닥 동시 전사에 의해 생성할 수 있다. RNAi에 사용되는 dsRNA의 생성 키트는 상업적으로 판매되는 제품(예를 들면, New England Biolabs, Inc.사의 제품)을 사용할 수 있다. dsRNA 또는 dsRNA를 제조하도록 처리된 플라스미드의 트랜스펙션 방법은 종래 공지의 기술이다.
- [0075] 안티센스 핵산 서열
- [0076] Wee1B를 코딩하는 핵산에 대해 안티센스인 핵산 분자를 저해제로 사용할 수 있다. '안티센스' 핵산은 Wee1B를 코딩하는 '센스' 핵산에 상보적인, 예를 들면 두 가닥 사슬 cDNA 분자의 코딩 가닥에 상보적이거나 mRNA 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 따라서, 안티센스 핵산은 센스 핵산과 수소 결합을 형성할 수 있다. 상기 안티센스 핵산 분자는 Wee1B mRNA의 전체 코딩 영역에 상보적일 수 있으나, Wee1B mRNA의 코딩 또는 비코딩 영역의 단지 일부(예: 번역 개시부)에만 안티센스인 올리고뉴클레오타이드가 더 바람직하다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면 약 5 내지 50 뉴클레오타이드의 길이일 수 있다.
- [0077] 안티센스 핵산은 공지의 방법을 이용한 화학 합성 및 효소 결합 반응을 이용하여 구성할 수 있다. 화학 합성법, 예를 들어 문헌[Tetrahedron Lett., 1991, 32, 30005-30008]에 기재된 바와 같이 아세트오니트릴 중에서 테트라에틸티우람 디숄파이드로 황화시키는 포스포아미다이트 화학과 같은 방법에 의해 매우 용이하게 제조할 수 있다.
- [0078] 상기 안티센스 핵산의 생성에 사용될 수 있는 변형 뉴클레오타이드의 예로는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸사이토신, 5-(카복시히드록실메틸)우라실, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, N6-아데닌, 5-카복실메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필)우라실, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노 메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 2,6-디아미노푸린, 5-메틸-2-티오우라실, 우라실-5-옥시아세트산(v), 슈도우라실, 케오신, 2-티오사이토신, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 5-메틸-2-티오우라실, (acp3)w 및 와이부톡소신일 수 있다. 필요에 따라서, 상기 안티센스 핵산은 발현 벡터를 사용하여 생물학적으로 생성할 수 있다.

- [0079] 항체
- [0080] "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편을 포함한다.
- [0081] "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 균질한 항체의 군집으로부터 수득한 항체를 나타내고, 즉, 군집을 구성하는 개별 항체들은 모노클로날 항체 생산시에 발생할 수 있는 가능한 변이체를 제외하고는 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 유도되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 유도된다. 그의 특이성에 이외에도 모노클로날 항체는 기타 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 점에서 유리하다. "모노클로날"이라는 수식어는 실질적으로 균질한 항체 군집으로부터 얻었다는 항체의 특징을 가리키는 것이며, 임의의 특정 방법에 의해 항체를 생산하여야 한다는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0082] "키메라 항체"는, 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이(Old World Monkey), 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는, "영장류화된" 항체를 포함한다.
- [0083] "항체 단편"은 바람직하게는 그의 항원-결합 영역 또는 가변 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체단편 (들)으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0084] Wee1B 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연적으로 발생된 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 Wee1B 항체의 초기 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위 지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0085] "Wee1B에 대한 특이적(specific) 결합"이라는 용어는 Wee1B만이 결합되는 것을 의미한다. 즉, 본 발명에 따른 항-Wee1B 항체의 결합은 Wee1B에 대해 선택적이다. 선택적으로 BIACORE 측정법의 이용을 포함하는 당해 기술분야의 숙련된 당업자들에게 공지된 방법들을 이용하여 친화도 측정을 할 수 있다. 특이적 결합을 측정하는 다른 적절한 방법들은 당해 기술분야의 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있을 것이다
- [0086] 또한, Wee1B 항체는 안정성 및/또는 반감기를 증가시키기 위해 개질될 수 있다. 예를 들어, 항체의 반감기는 항체 또는 항체 단편의 페그화(pegylation)에 의해 증가될 수 있다(예를 들어, Chapman AP, Adv Drug Deliv Rev 2002, 54; 531-545 참조). 본 발명에 따른 항체는 또한 향상 조작 기법(enhancement manipulation technique)들을 채용한 무장 분자로서 생성될 수 있다. 또한, 인간 면역글로불린의 Fc 불변 부분의 첨가나 체인 셔플링(chain shuffling)과 같은 기법들을 이용한 돌연변이 항체들의 생성에 의해 전체 항체가 구성될 수도 있다 항체는 진단 또는 치료제와 연결된 항체 구성요소를 포함하는 면역 접합체(immunoconjugate)로 생성될 수 있다. 상기 연결은 화학적 접합 또는 유전적 융합을 포함하는 해당 분야에서 숙련된 당업자가 인식하는 수단들에 의할 수 있다.
- [0087] 유전자 도입
- [0088] 본 발명에서, Wee1B의 발현 또는 활성 억제하기 위하여 Wee1B 유전자의 전사억제 물질, 번역 억제 물질, 또는 단백질 기능 억제 물질 등을 이용함에 있어서, 예를 들어, Wee1B siRNA를 인위적으로 삽입하기 위해 공지의 기술을 사용할 수 있다.
- [0089] 즉, 공지된 형질전환(transgenesis) 방법을 제한 없이 사용할 수 있는데, 예를 들어, 지질 매개 유전자 도입(lipid mediated gene transfer), 정자 매개 유전자 도입(sperm mediated gene transfer), 전기천공법(electroporation), 상동성 재조합(homologous recombination), 미세주입법 등을 들 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 미세주입법을 이용하였다.
- [0090] 미세 주입법(microinjection)은 핵산을 수정란 내부로 직접 주입하는 방법이다. 직접 원하는 유전자를 주입하기 때문에 유전자 삽입 효율이 좋고, 염색체에 넣은 유전자는 외부에서 온 유전자로 인식되지 않아 다음 세대로 유전되는 장점이 있다.

- [0091] 또한, 세포질 내 미세주입법은 핵과 난자 내 물질들과의 접촉을 극대화시키므로써 재프로그래밍을 촉진시킬 수 있는 장점도 있다.
- [0092] **배양**
- [0093] 본 발명의 방법에서는 Wee1B-siRNA가 주입된 난자를 체내 또는 체외 배양시킴으로써 난자를 성숙시킨다. 바람직하게는 체외 배양을 이용한다.
- [0094] 체외 성숙의 효율을 높이기 위해서는 상기 체외 성숙시간은 36~72 시간, 바람직하게는 48~72 시간, 더욱 바람직하게는 60~72시간, 가장 바람직하게는 70~02시간 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0095] 미성숙 난자는 보통 체외배양 후 36시간 이후에는 핵 성숙이 이루어져 난자의 핵은 제 2감수분열 중기 (metaphase II)에 이르러서 정자의 자극 (체외수정)전까지 휴지하게 되므로 최소 36시간 이상 배양하여야 한다. 그러나, 난자의 성숙이 완전해 지기 위해서는 세포질 성숙도 필요하므로 일반적으로 체외성숙 배양은 70~72 시간 정도인 것이 가장 바람직하다.
- [0096] 또한, 배양 배지는 미성숙 난자의 체외성숙에 사용되는 배지라면, 어느 것을 사용하여도 무방하다.
- [0097] 예를 들어, 조직배양배지(tissue culture medium, TCM)199 배양배지를 기본 배지로 하여 글루코오스, 푸트레신 (putrescine), 프로게스테론, 소듐 세레나이트, 인슐린, apo-트랜스페린, EGF, 및 페니실린 등을 첨가하여 사용할 수 있다. 이는 실험의 편의를 위하여 비교적 조성이 단순한 배지를 선택한 것에 불과하며 이에 한정되는 것은 아님은 자명하다.
- [0098] 본 발명의 일 실시예에서는 총 체외배양시간 (24 h, 48 h, 72 h)에 따른 개 난자의 발달율을 조사하였다. 각 처리구 별로 GV, GVBD, MI, MII 단계에서 핵의 발달을 확인시간별 체외 성숙도를 확인한 결과, 72 h에서 MI 또는 MII 발달율이 다른 그룹에 비하여 유의적으로 높음을 확인하였다.
- [0099] 또한, Wee1B-siRNA를 시간대 별(0 h, 24 h, 48 h, 72 h)로 세포질 내에 주입하여 각 단계별 발달율을 확인한 실시예를 통해, 0 h에 Wee1B-siRNA를 주입한 처리군이 다른 처리군에 비하여 MII까지의 발달율이 높음을 확인하고 MI단계까지의 발달과 MI 및 MII단계까지의 총 발달율이 다른 처리구보다 상대적으로 높은 결과를 확인하였다.
- [0100] Wee1B 유전자는 GV단계에서 MPF 불활성화에 관여하는 유전자로서, 본 발명의 Wee1B-siRNA 주입 방법에 따르면, Wee1B를 비활성화시킴으로써 GV 단계에 있는 개 난자를 다음 단계로의 발달을 유도할 수 있고, MII 단계로의 발달도 상대적으로 높게 유도할 수 있다.
- [0101] 즉, 본 발명에 의해, cAMP의 낮은 수준을 통해 비활성화된 PKA의 영향으로 Wee1B가 비활성이 되고, 따라서 활성화된 CDC25b의 영향으로 CDK1과 사이클린 B에 의한 MPF가 활성이 되면서 GV단계에서 GVBD단계로 핵이 발달이 진행됨으로써 MI 및 MII 단계까지 용이하게 발달할 수 있게 된다(도 3).
- [0102] 이처럼, 본 발명은 향상된 개 난자의 체외성숙 체계를 구축함으로써, 성숙된 체외 난자를 특수 목적견 등의 복제 등에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 본 발명은 이러한 모든 활용 가능성을 모두 포함한다.
- [0103] **<실시예>**
- [0104] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0105] **재료 및 방법**
- [0106] 1. 시약

- [0107] 다른 언급이 없는 한, 모든 화합물 및 배지는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.
- [0108] 2. 동물 케어 및 난소 회복
- [0109] 미성숙 난모세포에 대한 난소를 지방 동물 병원에서 난소절제술(hysterectomy)을 수행한 개로부터 수득하였다. 본 실험은 경상 대학교 가이드라인(Approval no.: GNU-131105-D0066)에 따라 수행되었다.
- [0110] 3. 미성숙 난모세포의 수집
- [0111] 난소는 개의 연령, 사춘기 상태, 발정 주기의 단계에 관계없이 사용하였다. 상기 난소는 제거 후 1시간 이내에 35 °C 하 0.9% 식염수에서 실험실로 옮겨졌다. 실험실에 도착하자마자, 38.5 °C에서 0.1% BSA (bovine serum albumin) 가 보충된 25 mM HEPES가 포함된 TCM-199 배지에 넣고, 난소 피질(ovarian cortex)을 즉시 면도칼로 슬라이스하였고, 100 μ m 이상의 세포질 직경을 가지고 뽕뽕한 난구세포로 둘러싸여 있는, 어둡고 구형의 난모세포(COCs; cumulus-oocyte complexes)를 사용을 위해 선별하였다.
- [0112] 4. 개 COCs의 In vitro 성숙화(IVM)
- [0113] COCs를 4-웰 배양 디쉬(Nunc, Roskilde, Denmark)에서 38.5°C 하 5% CO₂를 포함하는 습기찬 인큐베이터에서 대기 중 72시간 동안 배양하였다(처리 당 최소 15 난모세포). In vitro 성숙화를 위한 기본 배지는 0.6% 글루코오스, 60 nM putrescine, 20 nM 프로게스테론, 30 nM 소듐 세라나이트, 25 μ g/mL 인슐린, 100 μ g/mL apo-트랜스페린, 40 ng/mL EGF, 및 1% 페니실린으로 보충된 TCM-199 이었다.
- [0114] 5. 난구세포 제거된(디누딩된, Denuded) 난모세포 및 핵성숙의 평가
- [0115] 난구세포(CCs)를 제거하기 위해, 일단 배양이 완료되면, 난모세포를 0.1% hyaluronidase를 포함하는 750 μ l TCM-199로 4-웰 디쉬의 웰에 위치시키고, 반복되는 피펫팅에 의해 디누딩(denuding)시켰다. 그 후, 디누딩된 난모세포를 0.1% PVP (poly-vinylpyrrolidone)로 보충된 D-PBS 에서 세척(3회)하고, 3.7% 포름알데하이드로 고정하여, Hoechst 33342 fluorescent DNA 염료로 5분 동안 염색한 후 슬라이드 상에 놓고 커버 글라스로 덮었다. 형광 현미경을 사용하여 핵의 성숙을 측정하고 GV, GVBD, MI 또는 MII 단계로 분류하였다. 이를 도 1에 도시하였다.
- [0116] 6. 미세주입법(Microinjection)
- [0117] 마이크로조작기(micromanipulator) 상에 장착된 유리 마이크로피펫을 이용하여 디누딩된 GV 난모세포의 세포질에 10 pL의 50 μ M Wee1B-siRNA를 미세주입하였다(Femtojet 5247 microinjection system; Eppendorf, Hamburg, Germany). 그 후, 난모세포를 38.5°C에서 대기 중 72시간까지 미네랄 오일 하 5% CO₂를 포함하는 습기찬 인큐베이터에서 배양하였다. 이때 본 발명에서 사용한 Wee1B-siRNA의 서열은 서열번호 3으로 표시되는 gcaccgagtgcacatagat 서열을 갖는 siRNA를 사용하였다.
- [0118] 7. Wee1B-siRNA 주입된 난모세포에서 유전자 발현 분석
- [0119] Wee1B-siRNA (Respectively, n = 20) 를 세포질 미세주입 후, RNA를 0, 24, 48 또는 72시간 동안 in vitro 배양된 난모세포로부터 Arcturus PicoPure RNA isolation kit (Life Technologies Inc., Foster City, CA, USA)로 분리하였다.
- [0120] RNA 분리 후, cDNA를 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)로 합성하였다.
- [0121] 난모세포에서, 하우스키핑 유전자 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNA 와 관련된 MAPK3(mitogen-activated protein kinase 3) 및 MAPK1, 세포 분할 주기 25B (cdc25B), cAMP (cyclic

adenosine monophosphate) 의 발현 수준을 조사하기 위해, qPCR(quantitative real-time PCR)을 CFX96 real-time system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 상에서 iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)을 이용하여 수행하였다.

qPCR의 사이클링 조건은 95 ° C 하 3분 동안, 이어서 40 사이클을 10초 동안 95 ° C 하, 40 초 동안 55 ° C하, 및 40 초 동안 72 ° C로 이루어졌다. qPCR 에서 사용된 프라이머의 정보를 표 3에 나타내었다. 각 유전자에 대해 3번의 반복 실험을 하였다.

[표 1]

Gene symbol	Sequence	Product size (bp)	Accession number
GAPDH	F: AACAGTGACACCCACTCTTC(서열번호 1)	110	AB_038240
	R: CGGTGTCTGTAGCCAAATTC(서열번호 2)		
cAMP	F: CAGGTGACAGACTTCGGTTT(서열번호 3)	105	NM_001003032.1
	R: GTAGCCTTTGCTCAGGATGAT(서열번호 4)		
cdc25B	F: AATATCTGGGCAGTCCCATTAC(서열번호 4)	126	XM_003626604.1
	R: CCTTGCCCTCTTCTTGATCTT(서열번호 5)		
MAPK1	F: AGAGAACCCTGAGGGAGATAAA(서열번호 6)	90	NM_001110800
	R: CGATGGTTGGTGCTCGAATA(서열번호 7)		
MAPK3	F: CAACGACCATGTTTGCTACTTC(서열번호 8)	112	NM_001252035.1
	R: GGTGTTGATGAGCAGGTIAGA(서열번호 9)		

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cAMP: Cyclic adenosine monophosphate, cdc25B: cell division cycle 25, MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1, MAPK3: Mitogen-activated protein kinase 3.

8. 실험 디자인

본 실험에서, 모든 실험을 실험 디자인 당 최소 3번씩 반복하였다

실험 1은 최적의 IVM 시간을 평가하기 위해 고안되었다. 전체로서, 337 COCs가 24, 48 또는 72 시간 동안 대기 중 5% CO₂ 포함하는 습기찬 인큐베이터에서 38.5°C 하 성숙되고, CCs가 제거된 후, 디누딩된 난모세포를 염색하여 핵 단계를 분석하였다. 감수분열 재개(meiotic resumption)의 각 단계의 전체 수 퍼센트를 기록하였다.

실험 2는: 디누딩된 개 난모세포의 세포질 내로 Wee1B-siRNA의 최적의 주입 시간 포인트를 확인하기 위해 고안되었다(주입은 0, 24, 48 또는 72 h에 이루어짐). 상기 그룹들을 배양 시간에 따라 4개의 그룹으로 나누었다(0 h 그룹은 회복된 난모세포로부터 고 퀄리티의 것을 선별한 후 0시간 때 주입, 24 h 그룹은 배양 후 24 시간 때 주입, 48 h 그룹은 배양 후 48시간 때 주입, 72 h 그룹은 배양 후 72시간 때 주입).

Wee1B-siRNA 미세주입 후, 이러한 난모세포를 72 h까지 in vitro 성숙시키고, 72 h 그룹을 38.5°C 하 5% CO₂ 포함하는 습기찬 인큐베이터에서 대기 중 84시간까지 in vitro 성숙시켰다. 감수분열 재개(meiotic resumption)의 각 단계의 전체 수의 퍼센트를 기록하였다. 전체 384 난모세포에서, 주입 또는 비-주입(대조군) 두 경우 모두 사용되었다.

실험 3: 은, Wee1B-siRNA를 0h에 개 난모세포의 세포질 내로 주입한 후, 다양한 배양 시간(0, 24, 48 또는 72 h)에 따른 개 난모세포에서 핵 성숙에 관한 Wee1B 메커니즘을 알아보기 위해 고안되었다. IVM 후, 전체 RNA를 분리하고 PCR에 의해 분석하였다. cAMP, cdc25B, MAPK1 및 MAPK3 mRNA의 발현 수준을 조사하였다.

9. 통계학적 분석

개 난모세포 성숙율은 퍼센트(%)로 표시하였다. 난모세포 성숙에서 유의한 차이는 Least-square means에 의해

SAS 9.3 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 확인하였다. 성숙 관련 유전자 발현 데이터는 mean $\pm$ SD로 표시하였고 Students t-test로 확인하였다. 모든 실험은 최소 3번 수행하였다. 차이(P < 0.05)는 유의한 것으로 간주되었다.

[실시예 1 : 난모세포의 성숙율]

MII에 대한 난모세포의 성숙율을 하기 표 2에 도시하였다.

[표 2]

No. oocytes developed to (%)	Culture time (h)		
	24	48	72
GV	71.4 ^a	59.7 ^a	43.6 ^a
GVBD	22.8 ^a	23.8 ^a	27.2 ^a
MI	5.7 ^b	14.9 ^a	22.4 ^a
MII	0.0 ^b	1.4 ^b	5.4 ^a
MI or MII	5.7 ^b	16.4 ^{a,b}	27.8 ^a
Total no. oocytes cultured	105	67	165

^{a,b} Within a row, percentages without a common superscript differed (P < 0.05).

GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle break-down; MI: metaphase I; MII: metaphase II.

MII에 대한 난모세포의 성숙율은 24 및 48 h 그룹과 비교하여 72h 그룹이 더 높았다(P < 0.05) (각각 5.4% vs. 0.0 및 1.4%, 표 2).

대부분 난모세포는 24, 48 및 72 h 성숙 동안 GV에서 어레스트되었다 (71.4, 59.7 및 43.6%). MI 또는 MII에 대한 난모세포의 성숙율은 24 h 그룹과 비교하여 (5.7%) 72h 그룹이 더 높았지만(27.8%) 48 그룹과는 크게 차이나지 않았다 (27.8% vs. 16.4%; 표 2).

이를 통해, IVM는 바람직하게는 48시간 이상, 가장 바람직하게는 72 시간이 난모세포 성숙에 필요한 최적 기간 (Optimal duration)임을 알 수 있었다.

[실시예 2 : 세포질 내로의 Wee1B-siRNA 주입의 효과]

세포질 내로의 Wee1B-siRNA 주입의 효과를 분석하기 위해, 주입 후 시간에 따른 각 단계의 발달율을 표 3에 기재하였다

[표 3]

No. oocytes developed to (%)	Injection time (h)				
	control	0	24	48	72 ^s
GV	50.5 ^{a,b}	26.2 ^{a,b}	48.5 ^{a,b}	15.9 ^b	50.0 ^a
GVBD	25.2 ^{a,c}	9.8 ^c	17.1 ^{b,c}	43.1 ^a	40.0 ^{a,b}
MI	22.1 ^b	45.9 ^a	22.8 ^b	26.1 ^{a,b}	10.0 ^b
MII	2.1 ^{b,c}	18.0 ^a	11.4 ^{a,b}	14.7 ^a	0.0 ^c
MI or MII	24.2 ^{b,c}	63.9 ^a	34.2 ^{b,c}	40.9 ^{a,b}	10.0 ^c
Total no. oocytes cultured	95	61	70	88	70

^{a-c} Within a row, percentages without a common superscript differed (P < 0.05).

[0142] 상기 표에서 알 수 있는 바와 같이, 0 h의 IVM 주입 그룹에서 MII에 대한 난모세포의 성숙율이 대조군 및 72h 그룹과 비교해서 더 높았고(18.0% vs. 2.1 및 0.0%), 24 및 48 h 그룹과는 크게 다르지 않았다 (18.0% vs. 11.4 and 14.7%; 표 3). 또한, 이들 그룹에서, MI에 대한 성숙율이 대조군, 24 및 72 h 그룹과 비교하여 0h 그룹에서 더 높았지만 (45.9% vs. 22.1, 22.8 및 10.0%), 48 h 그룹과는 큰 차이를 나타내지 않았다 (45.9% vs. 26.1%).

[0143] **실시예 3 : qPCR에 의한 성숙 관련 유전자 분석**

[0144] 0 h에 Wee1B-siRNA의 개 난모세포질로의 미세주입 후 0, 24, 48 또는 72 h의 배양 시간 포인트 상에서 cAMP, cdc25B, MAPK1, 및 MAPK3 mRNA의 발현 수준을 qPCR에 의해 분석하고, GAPDH에 의해 정상화하였다.

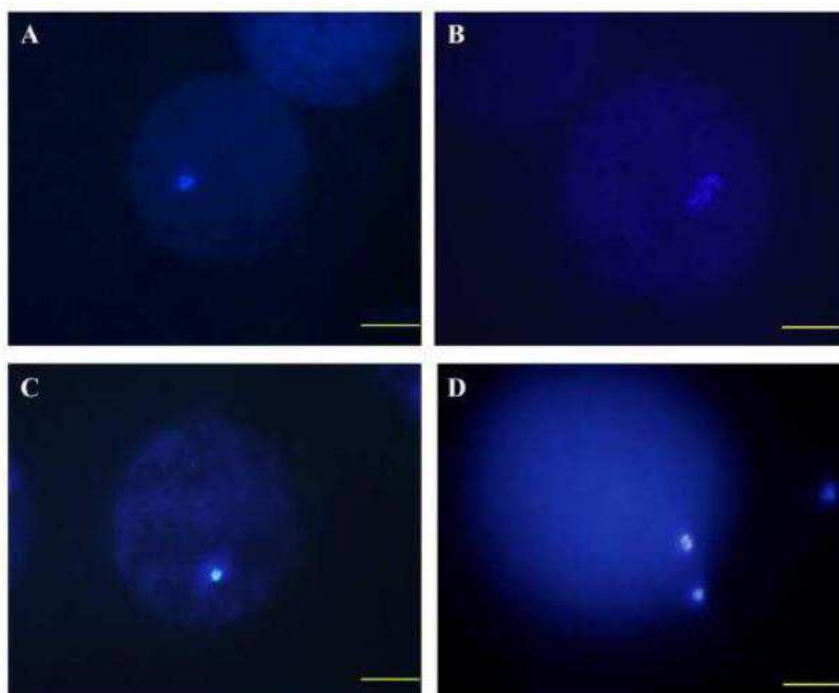
[0145] 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0146] 48 h 동안 배양된 난모세포에서 cAMP mRNA의 발현 수준이 가장 낮았고 ($P < 0.05$), 다른 그룹 사이에서 통계학적으로 차이는 없었다(도 2A). 또한, Wee1B-siRNA 주입된 난모세포에서 cdc25B mRNA의 발현 수준은 대조군, 24 및 72 h 그룹 사이에 차이가 없었고, 그러나 다른 실험 군과 비교하여 48h 그룹에서 가장 낮았다 ($P < 0.05$) (도 2B). Wee1B-siRNA 주입 후 72h 동안 배양된 난모세포에서는 MAPK1 및 MAPK3 mRNA의 발현 수준이 다른 실험 군과 비교하여 가장 높게 나타났다 (도 2C 및 2D).

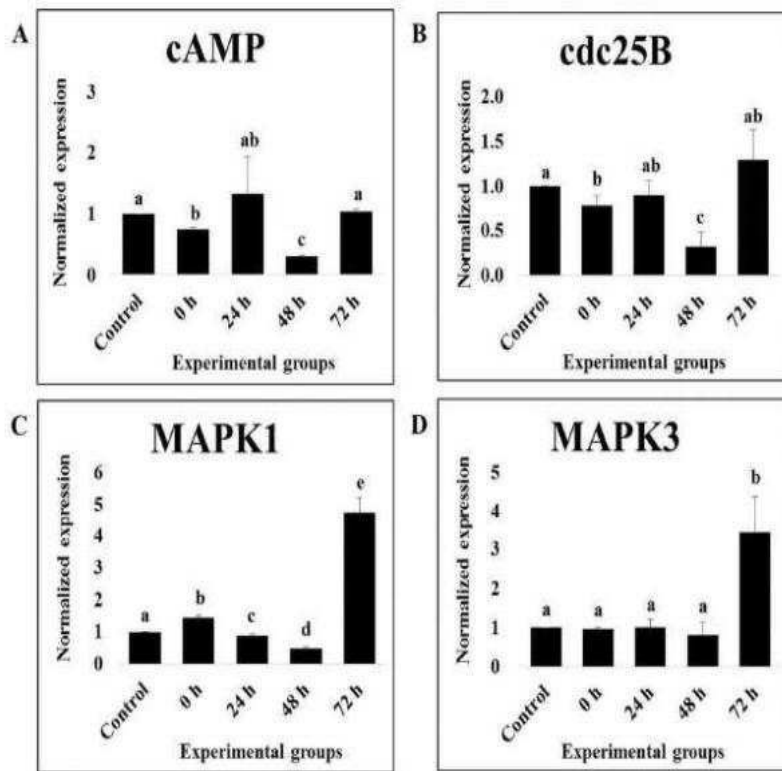
[0147] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 이와 같은 우수한 효과를 통해, 당업자들은 다른 생물학적 물질, 예컨대, 인간을 포함한 말, 염소, 돼지 등에게도 용이하게 적용가능함은 명확히 이해될 것이다.

도면

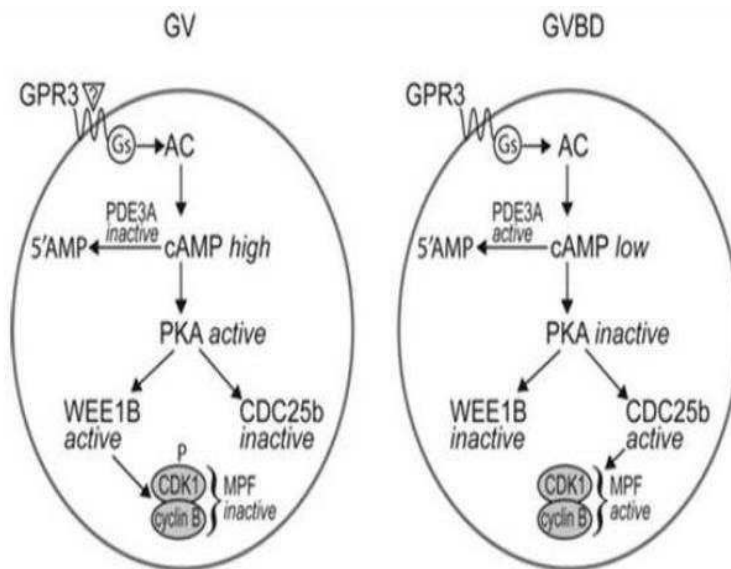
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Gyeongsang National University
- <120> Method for promoting nuclear maturation of canine oocytes
- <130> pn1411-350

<160> 3

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 48

<212> PRT

<213> Wee1B amino acid sequence

<400> 1

Ile Gly Arg Leu Gly Pro Leu Asp Ala Cys Ser Ser Gly Arg Gln Cys

1 5 10 15

Asp Gly Tyr Leu Gln Asn Ser Pro Phe Gln Ala Pro Ser Glu His Arg

20 25 30

Ser Ser Gly Arg Glu Gln Gly Arg Ile Pro Ala His Trp Arg Pro Leu

35 40 45

<210> 2

<211> 148

<212> DNA

<213> Wee1B DNA sequence

<400> 2

atatagggcg attgggccct ctagatgcat gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatattc 60

tgcagaattc gcccttccaa gcaccgagtg agcatagatc ctcgggaagg gagcaagggc 120

gaattccagc aactggcgg ccgttact 148

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Wee1B siRNA sequence

<400> 3

gcaccgagtg agcatagat 19